



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 31/70, C07H 21/04, 21/04	A1	(11) 国際公開番号 WO96/35430 (43) 国際公開日 1996年11月14日(14.11.96)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01234 (22) 国際出願日 1996年5月10日(10.05.96)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平7/114990 1995年5月12日(12.05.95) JP 特願平7/285504 1995年11月2日(02.11.95) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 Osaka, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および (72) 発明者 森下竜一(MORISHITA, Ryuichi)[JP/JP] 〒532 大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502 Osaka, (JP) 荻原俊男(OGIWARA, Toshio)[JP/JP] 〒562 大阪府箕面市桜ヶ丘2-7-29 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 杉本聡子(SUGIMOTO, Toshiko)[JP/JP] 〒603 京都府京都市北区小山南大野町33-4-201 Kyoto, (JP)</p>		<p>前田和宏(MAEDA, Kazuhiro)[JP/JP] 〒635 奈良県大和高田市東中1-7-38 Nara, (JP) 川村郁夫(KAWAMURA, Ikuo)[JP/JP] 〒573 大阪府枚方市東中振2-9-1-715 Osaka, (JP) 千葉敏行(CHIBA, Toshiyuki)[JP/JP] 〒630 奈良県奈良市中辻町1-1-503 Nara, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 関 英男(SEKI, Hideo) 〒532 大阪府大阪市淀川区加島2丁目1番6号 藤沢薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。</p>
<p>(54) Title REMEDY AND PREVENTIVE FOR DISEASES CAUSED BY NF-κB</p> <p>(54) 発明の名称 NF-κBに起因する疾患の治療および予防剤</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The administration of a compound as a decoy specifically antagonizing the nucleic acid site to which a transcription regulator NF-κB binds in order to effectively treat and prevent diseases caused by NF-κB such as ischemic diseases, inflammatory diseases, autoimmune diseases, infiltrating metastasis of cancer, cachexia, etc.</p>		

(57) 要約

転写調節因子NF- κ Bに起因する疾患、例えば虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、ガンの転移浸潤、悪液質等の疾患の治療および予防に、NF- κ Bが結合する核酸部位と特異的に拮抗する化合物であるデコイの投与は有効である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	グレートブリテン及び北アイルランド連合王国	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バ베이ラ	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GE	ジョージア	MC	モナコ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SS	ス威士チランド
BR	ブラジル	GU	グアム	MG	マダガスカル	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	TG	トーゴ
CC	カカス	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MW	モザンビーク	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボワール	KG	キルギスタン	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	US	合衆国
CN	中国	KR	大韓民国	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国			NZ	ニュージーランド		

明 細 書

NF- κ Bに起因する疾患の治療および予防剤

5 技術分野

本発明は、サイトカインや接着因子等の転写調節因子の1つとして知られるNF- κ Bに起因する様々な疾患の予防又は治療に関する。詳細にはNF- κ Bのデコイ、該デコイを含有するNF- κ Bに起因する疾患の治療および予防剤ならびに治療および予防方法に関する。

10

背景技術

喘息、ガン、心臓病、自己免疫疾患およびウイルス感染症などの様々な疾患は、異なる症状を示すにも拘わらず、1種類または数種類の蛋白質が、過剰発現あるいは過少発現したことが原因の多くを占めることが示唆されている。また、蛋白質の

15 発現には様々な転写活性化因子および転写抑制因子等の転写調節因子が関与している。転写調節因子の1つとして知られているNF- κ Bは、p65とp50のヘテロダイマーからなっている。通常は、細胞質内に阻害因子I κ Bが結合した形で存在し、核移行が阻止されている。ところが、何らかの原因でサイトカインや、虚血、再灌流といった何らかの刺激が加わるとI κ Bがリン酸化され、分解されることに

20 より、NF- κ Bは活性化されて核内に移行する。NF- κ Bは染色体のNF- κ B結合部位に結合することにより、その下流にある遺伝子の転写を促進する。NF- κ Bにより制御される遺伝子には、例えば、IL-1、IL-6、IL-8などのサイトカイン類や、VCAM-1やICAM-1などの接着因子がある。

25 発明の開示

これらのサイトカイン類や接着因子の生産の活性化が、虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、ガンの転移浸潤、悪液質等の種々の疾患を引き起こす一つの原因となっていると予測し、鋭意研究の結果、NF- κ Bに起因する疾患の治療には、NF- κ Bの核酸結合部位に対するデコイ、つまりNF- κ Bが結合する核酸部位と

特異的に拮抗する化合物を投与することによりNF- κ Bにより活性化される遺伝子の発現を抑制することが非常に有効であることを見だし、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、NF- κ Bのデコイを主成分として含有する、NF- κ Bに起因する種々の疾患の治療および予防剤及びその予防治療方法を提供するものである。

本発明の治療予防剤の対象とする疾患は、NF- κ Bに起因する疾患、すなわち、転写調節因子NF- κ Bが制御する遺伝子の所望しない活性化に起因する疾患であり、このような疾患としては、例えば虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患、ガンの転移・浸潤、悪液質等が挙げられる。虚血性疾患としては虚血性臓器疾患（例えば心筋梗塞、急性心不全、慢性心不全等の虚血性心疾患、脳梗塞等の虚血性脳疾患および肺梗塞等の虚血性肺疾患等）、臓器移植・臓器手術後の予後の悪化（例えば心移植、心臓手術、腎移植、腎臓手術、肝移植、肝臓手術、骨髄移植、皮膚移植、角膜移植、肺移植等の予後の悪化）、再灌流障害、PTCA後の再狭窄等が挙げられる。炎症性疾患としては腎炎、肝炎、関節炎等の種々の炎症、急性腎不全、慢性腎不全、動脈硬化等が挙げられる。また、自己免疫疾患としてはリウマチ、多発性硬化症、橋本甲状腺炎等が挙げられる。特に本発明により得られるNF- κ Bのデコイを主成分として含有する医薬品は、虚血性疾患の再灌流障害、臓器移植又は臓器の手術後の予後の悪化、PTCA後の再狭窄、ガンの転位・浸潤、ガン発生後に伴う体重減少等の悪液質の治療および予防には好適である。

本発明で用いられるNF- κ Bのデコイとしては、染色体上に存在するNF- κ Bの核酸結合部位と特異的に拮抗する化合物であればよく、例えば核酸およびその類似体が含まれる。好ましいNF- κ Bのデコイの例としては、核酸配列 GGGATT TCCC（配列表の配列番号1の5'末端から8から17番目の配列）またはその相補体を含むオリゴヌクレオチド、その変異体、またはこれらを分子内に含む化合物があげられる。オリゴヌクレオチドはDNAでもRNAでもよく、またそのオリゴヌクレオチド内に核酸修飾体または／および擬核酸を含むものであってもよい。また、これらのオリゴヌクレオチド、その変異体、またはこれらを分子内に含む化合物は1本鎖でも2本鎖であってもよく、線状であっても環状であってもよい。変異体とは上記配列の一部が、変異、置換、挿入、欠失しているもので、NF- κ Bが

結合する核酸結合部位と特異的に拮抗する核酸を示す。さらに好ましいNF- κ Bのデコイとしては、上記核酸配列を1つまたは数個含む2本鎖オリゴヌクレオチドまたはその変異体があげられる。本発明で用いられるオリゴヌクレオチドは、リン酸ジエステル結合部の酸素原子をイオウ原子で置換したチオリン酸ジエステル結合をもつオリゴヌクレオチド(S-オリゴ)、または、リン酸ジエステル結合を電荷をもたないメチルホスフェート基で置換したオリゴヌクレオチド等の生体内でオリゴヌクレオチドが分解を受けにくくするために改変したオリゴヌクレオチド等が含まれる。

本発明で用いられるNF- κ Bのデコイの製造方法としては、一般的な化学合成法または生化学合成法を用いることが出来る。例えばNF- κ Bのデコイとして核酸を用いる場合、遺伝子工学で一般的に用いられる核酸合成法を用いることが出来る、例えば、DNA合成装置を用いて目的のデコイヌクレオチドを直接合成してもよいし、またこれらの核酸、それを含む核酸またはその一部を合成した後、PCR法またはクローニングベクター等を用いて核酸を増幅してもよい。さらに、これらの方法により得られた核酸を、制限酵素等を用いて切断後、DNAリガーゼ等を用いて結合等を行い目的とする核酸を製造してもよい。また、さらに細胞内でより安定なデコイヌクレオチドを得るために、核酸の塩基、糖、リン酸部分を例えばアルキル化、アシル化等の化学修飾を施してもよい。

本発明により得られるNF- κ Bのデコイを主成分として含有する製剤は、主薬が患部の細胞または目的とする組織の細胞内に取り込まれるような製剤であれば特に限定されるものではなく、NF- κ Bのデコイ単独で、もしくは慣用の担体と混合して、経口投与、非経口投与、局所投与ないしは外用の形で投与される。これらの製剤は溶液、懸濁液、シロップ、リポソーム製剤、乳剤、シロップ等の液体の投与形態であってもよいし、錠剤、顆粒剤、粉末剤、カプセル剤などの固形の投与形態であってもよい。必要に応じ、上記製剤には各種の担体、助剤、安定剤、潤滑剤、その他一般に使用される添加剤、例えば乳糖、クエン酸、酒石酸、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、白陶土、蔗糖、コーンスターチ、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、落下生油、オリーブ油、カカオバター、エチレングリコールなどを添加することができる。

特に、NF- κ Bのデコイとして核酸またはその修飾体を用いる場合には、好ましい製剤としては一般に用いられている遺伝子導入法で用いられる形態、例えばセンダイウイルス等を用いた膜融合リポソーム製剤やエンドサイトーシスを利用するリポソーム製剤等のリポソーム製剤、リポフェクトアミン（ライフテックオリエンタル社製）等のカチオン性脂質を含有する製剤またはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター等を用いるウイルス製剤を用いるのが有利であり、特に膜融合リポソーム製剤が好ましい。

リポソーム製剤は、そのリポソームの構造体が、大きな1枚膜リポソーム（LUV）、多重層リポソーム（MLV）、小さな一枚膜リポソーム（SUV）のいずれであってよい。その大きさも、LUVでは200から1000 nm、MLVでは400から3500 nm、SUVでは20から50 nm程度の粒子系をとり得るが、センダイウイルス等を用いる膜融合リポソーム製剤の場合は粒子系200から1000 nmのMLVを用いるのが好ましい。

リポソームの製造方法は、デコイが保持されるものであれば特に限定されるものではなく、慣用の方法、例えば逆相蒸発法（Szoka, F., et al: Biochim. Biophys. Acta, Vol. 601 559 (1980)）、エーテル注入法（Deamer, D. W. : Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 308 250 (1978)）、界面活性剤法（Brunner, J., et al: Biochim. Biophys. Acta, Vol. 455 322 (1976)）等を用いて製造することができる。

リポソーム構造を形成するための脂質としてはリン脂質、コレステロール類や窒素脂質等が用いられるが、一般的にはリン脂質が好適であり、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、カルジオリピン、スフィンゴミエリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、リゾレシチン、等の天然リン脂質、あるいはこれらを常法によって水素添加したものその他、ジセチルホスフェート、ジステアロイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルセリン、エレオステアロイルホスファチジルコリン、エレオステアロイルホスファチジルエタノールアミン、エレオステアロイルホスファチジルセリン等の合成リン脂質等を使用することができる。

これらのリン脂質を含む脂質類は単独で用いることもできるが、2種以上を併用することも可能である。このとき、エタノールアミンやコリン等の陽性基をもつ原子団を分子内に持つものを用いることにより、電氣的に陰性なデオイヌクレオチドの結合率を増加させることもできる。これらリポソーム形成時の主要リン脂質の他に一般にリポソーム形成用添加剤として知られるコレステロール類、ステアリルアミン、 α -トコフェロール等の添加剤を用いることもできる。

このようにして得られるリポソームは患部の細胞または目的とする組織の細胞内に取り込みを促進するために、膜融合促進物質、例えばセンダイウイルス、不活化センダイウイルス、センダイウイルスより精製された膜融合促進蛋白質、ポリエチレングリコール等を加えることができる。

リポソーム製剤の製造法の例を具体的に説明すると、たとえば前記したリポソーム形成物質をコレステロール等と共にテトラヒドロフラン、クロロホルム、エタノール等の有機溶媒に溶解し、これを適当な容器に入れて減圧下に溶媒を留去して容器内面にリポソーム形成物質の膜を形成する。これにNF- κ Bのデオイを含有する緩衝液を加えて攪拌し、得られたリポソームにさらに所望により前記した膜融合促進物質を加えた後、リポソームを単離する。このようにして得られるNF- κ Bのデオイを含有するリポソームは適当な溶媒中に懸濁させるか、或いはいったん凍結乾燥したものを適当な溶媒に再分散させて治療に用いることができる。膜融合促進物質はリポソーム単離後、使用までの間に加えてもよい。

この様にして得られたNF- κ Bのデオイを主成分として含有する製剤における、デオイの含有割合は、NF- κ Bに起因する疾患を有効に阻止できる量が含有されていれば特に限定されず、適用疾患、適用部位、投与形態および投与方法に応じて種々設定することができる。

この様にして得られるNF- κ Bを主成分として含有する医薬品は、疾患の種類、使用するデオイの種類等により各種の方法で投与することができ、例えば虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患およびガンの転移・浸潤、悪液質においては血管内投与、疾患部位に塗布、疾患部位内に投与または疾患部位に血管内投与等する事ができる。さらに具体的な例としては、たとえば臓器梗塞等でPTCAを行う場合には、同時またはその前後に患部血管に投与する事ができ、また、臓器移植等では移

植する臓器を予め本願で用いられる製剤で処置して用いてもよい。また、たとえば変形関節炎リュウマチ等では直接関節内に注入して用いることもできる。

- NF- κ Bのデコイの投与量は、年齢その他患者の条件、疾病の種類、使用するデコイの種類等により適宜選択されるが、例えば血液内投与、筋肉内投与、関節内投与等では一般には1回あたり10から10,000 nmoleを1日1回から数回投与する事ができる。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施例によりさらに具体的に説明する。

10 実施例1 NF- κ Bのデコイ（デコイオリゴヌクレオチド）の合成

- DNA合成機でS-オリゴ用いて、それぞれ下記の塩基配列を持つNF- κ Bのデコイオリゴヌクレオチドおよびスクランブルデコイオリゴヌクレオチド（NF- κ Bのデコイヌクレオチドと同じ塩基組成を持つが配列がランダムなヌクレオチド）を合成した。これらのヌクレオチドを80度、30分加熱した後、室温に2時間かけて室温まで冷却し、2本鎖DNAを得た。

NF- κ Bデコイオリゴヌクレオチド

CCTGAAGGGATTCCCTCC

GGAAGTCCCTAAAGGGAGG

20 スクランブルデコイオリゴヌクレオチド

TTGCCGTACCTGACTTAGCC

AACGGCATGGACTGAATCGG

実施例2 リポソーム製剤の製造

- フォスファチジルセリン、フォスファチジルコリンおよびコレステロールを重量比1:4.8:2（合計10mg）をテトラヒドロフランに溶解させた。ロータリーエバポレーターを用いて、この脂質溶液からテトラヒドロフランを除去し、脂質をフラスコ表面に付着させた。このフラスコに、実施例1で得られたNF- κ Bデコイオリゴヌクレオチド（0.7mg）を含む生理食塩水（BSS; 139mM NaCl, 5.4mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.6）200mlに加え、常法により、攪拌及び超音波処理し、NF- κ

Bのデコイオリゴヌクレオチドを含むリポソーム懸濁液を調製した。得られたリポソーム懸濁液 (0.5ml, 10mg の脂質を含有) に、精製したセンダイウイルス (Z株: 10000 hemagglutinating units) を使用する3分前にUV照射 (110erg/mm²/sec) で不活化したものを混合し、BSSで合計4mlとした。混合物を4℃で5分間保持した後、37℃で穏やかに30分間振とうした。スクロース密度勾配遠心により、リポソームに結合していないセンダイウイルスを除いた後、最上層を採取し、BSSで濃度を調節し、8 μMのNF-κBデコイオリゴヌクレオチドが封入されたリポソーム製剤を得た。同様にNF-κBデコイオリゴヌクレオチドの代わりに実施例1で得られたスクランブルデコイオリゴヌクレオチドを用いて製剤を得た。

10 実施例3 再灌流モデル実験

(1) 実験方法

9-10週齢のSDラットをペントバルビタールナトリウムで麻酔した後、気道に近接した左頸動脈にカニューレを挿入し心臓の大動脈弁の近傍 (冠動脈の流入口の近く) に留置した。さらに、気管にカニューレをほどこし、人工呼吸器につないで人工呼吸をおこなった。その後、左胸部肋間を切開し、ラット心臓の左前下行枝を糸で結紮し、虚血を作成した。30分後、結紮した糸を切り、再灌流を開始した後すぐに実施例2で作成したリポソームに封入したNF-κBデコイヌクレオチドおよびスクランブルデコイヌクレオチドを1.5ml/ラットで冠動脈の流入口の近くに留置したカニューレにより投与した。その後、閉胸し、気管も縫合し生存放置しておく。24時間後、ラットを再度麻酔し、心臓を取り出し、生理食塩水で洗浄した後、ラット心室を6切片に切断し、TTC (塩化テトラゾリウム) 染色を行った。6切片の写真を取り、それぞれ画像解析を行った。なお、梗塞領域は以下の式に従って算出した。

$$\text{梗塞率 (\%)} = 6 \text{ 切片の梗塞面積の和} / 6 \text{ 切片の面積の和} \times 100$$

25 なお、統計計算は多重間比較 (Anova) にて実施した。

(2) 結果

結果を表1に示した。無処置群とスクランブルデコイ投与群においては、両間にはほぼ同程度の心筋梗塞の発生が観察されたが、NF-κBデコイヌクレオチド投与群ではその発生が19%と、無処置群並びにスクランブルデコイ投与群に比し梗塞

が有意 ($P < 0.01$) に抑制されていた。

表 1

	NF- κ B デコイヌクレオチド投与群	スクランブルデコイ投与群	無処置群
心筋梗塞面積／ 全面積	$19 \pm 2\%$	$28 \pm 1\%$	$28 \pm 1\%$

なお、梗塞直前投与においても同様に抑制効果が得られた。

5 実施例 4 ガン転移の抑制

(1) 実験方法

7週令のC57BL/6系雌性マウスに、マウス細網肉腫M5076細胞 1×10^4 個を静脈内投与し、その24時間後に、実施例2と同様にして製造したNF- κ Bデコイヌクレオチド0.2ml (6nmoles) を静脈内投与した。コントロール群には生理食塩水0.2mlを投与した。M5076の静脈内投与後14日目に解剖し、肝臓表面上の腫瘍結節数を実体顕微鏡下で計数した。一群当たり10匹のマウスを用いた。統計学的解析には、Kruskal-Wallisの検定及びDunnettの多重比較検定を用いた。

(2) 結果

15 コントロール群の腫瘍結節数が、平均値166、中央値173 (116~198)であったのに対しNF- κ Bデコイ投与群では、平均値29、中央値27 (19~54)であり、NF- κ Bデコイ投与群とコントロール群との間には危険率1%以下で有意な差が認められた。

実施例 5 悪液質の抑制

20 (1) 実験方法

7週令のBALB/c系雄性マウスに、マウス結腸ガンColon26の2mm角の腫瘍片を皮下移植し、その7日目からNF- κ Bデコイまたはスクランブルデコイ各0.2ml (6nmoles) を腫瘍内に投与し、経時的に体重及び腫瘍重量を計測した。また、13日目に解剖し、副睾丸脂肪及び腓腹筋を摘出し、その重量を測定した。

さらに、残ったすべての臓器及び腫瘍を除いたカルカス湿重量を測定した。腫瘍重量は、各腫瘍の長径及び短径より以下の式にて腫瘍重量を計算した。

$$\text{腫瘍重量 (mg)} = \text{長径} \times \text{短径}^2 / 2$$

一群当たり 10 匹のマウスを用いた。統計学的解析には、一元配置分散分析及び

5 Dunnett の多重比較検定を用いた。

(2) 結果

担癌群においては腫瘍の増殖に伴い、体重、副睾丸脂肪重量、腓腹筋重量及びカルカス湿重量の有意な減少が認められた。NF- κ B デコイ投与群では、体重を 4 7 %、副睾丸脂肪重量を 4 2 %、腓腹筋重量を 6 0 % 及びカルカス湿重量を 5 2 %

10 改善させたが、スクランブルデコイ投与群では全く回復作用を示さなかった。腫瘍重量には明らかな作用は認められなかった。

配列表

(1) 配列番号 : 1 :

15 (i) 配列の特徴

- (A) 配列の長さ : 20
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 2 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状

20 (i i) 配列の種類 : 合成 DNA

(i i i) 配列 : 配列番号 : 1 :

CCTTGAAGGG ATTTCCCTCC

20

(1) 配列番号 : 2 :

(i) 配列の特徴

- 25 (A) 配列の長さ : 20
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 2 本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (i i) 配列の種類 : 合成 DNA

(i i i) 配列 : 配列番号 : 2 :
TTGCCGTACC TGACTTAGCC

20

請求の範囲

1. NF- κ Bのデコイを含有するNF- κ Bに起因する疾患の治療および予防剤。
2. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患である請求の範囲第1項記載の治療および予防剤。
3. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性疾患である請求の範囲第1項記載の治療および予防剤。
4. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性疾患の再灌流障害、臓器移植又は臓器の手術後の予後の悪化、PTCA後の再狭窄である請求の範囲第1項記載の治療および予防剤。
5. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性心疾患の再灌流障害、心臓移植又は心臓の手術後の予後の悪化、PTCA後の再狭窄である請求の範囲第1項記載の治療および予防剤。
6. NF- κ Bに起因する疾患がガンの転移・浸潤、悪疫質である請求の範囲第1項記載の治療および予防剤。
7. 配列表の配列番号：1に記載された配列の5'末端から8から17番目で表される配列をもつ核酸およびその変異体を含む核酸。
8. NF- κ Bのデコイが請求の範囲第7項記載の核酸である請求の範囲第1項記載の治療および予防剤。
9. 請求の範囲第7項記載のNF- κ Bのデコイを含有するリポソーム製剤。
10. NF- κ Bのデコイの有効量を哺乳動物に投与することからなるNF- κ Bに起因する疾患の治療および予防方法。
11. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患である請求の範囲第10項記載の治療および予防方法。
12. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性疾患である請求の範囲第10項記載の治療および予防方法。
13. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性疾患の再灌流障害、臓器移植又は臓器の手術後の予後の悪化、PTCA後の再狭窄である請求の範囲第10項記載の治療および予防方法。

14. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性心疾患の再灌流障害、心臓移植又は心臓の手術後の予後の悪化、PTCA後の再狭窄である請求の範囲第10項記載の治療および予防方法。
15. NF- κ Bに起因する疾患がガンの転移・浸潤、悪疫質である請求の範囲第10項記載の治療および予防方法。
16. NF- κ Bのデコイが請求の範囲第7項記載の核酸である請求の範囲第10項記載の治療および予防方法。
17. NF- κ BのデコイのNF- κ Bに起因する疾患の治療および予防のための使用。
- 10 18. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性疾患、炎症性疾患、自己免疫疾患である請求の範囲第17項記載の治療および予防のための使用。
19. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性疾患である請求の範囲第17項記載の治療および予防のための使用。
- 20 15 20. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性疾患の再灌流障害、臓器移植又は臓器の手術後の予後の悪化、PTCA後の再狭窄である請求の範囲第17項記載の治療および予防のための使用。
21. NF- κ Bに起因する疾患が虚血性心疾患の再灌流障害、心臓移植又は心臓の手術後の予後の悪化、PTCA後の再狭窄である請求の範囲第17項記載の治療および予防のための使用。
- 20 22. NF- κ Bに起因する疾患がガンの転移・浸潤、悪疫質である請求の範囲第17項記載の治療および予防のための使用。
23. NF- κ Bのデコイが請求の範囲第7項記載の核酸である請求の範囲第17項記載の治療および予防のための使用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01234

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10-23
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions of claims 10 to 23 pertain to methods for treatment of the human or animal body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01234

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K31/70, C07H21/04, C07H21/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K31/70, C07H21/04, C07H21/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A, P	JP, 7-170998, A (Yissum Research Development Co. of the Hebrew University of Jerusalem), July 11, 1995 (11. 07. 95), Claim & EP, 652290, A	1 - 9
A	JP, 6-508029, A (Cetus Oncology Corp.), September 14, 1994 (14. 09. 94), Claim & WO, 9220795, A	1 - 9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 2, 1996 (02. 09. 96)

Date of mailing of the international search report

September 10, 1996 (10. 09. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの１の続き）

法第８条第３項（P C T １７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 10-23 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 10-23 の発明は、治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの２の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl. A 61K 31 / 70, C 07H 21 / 04, C 07H 21 / 04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl. A 61K 31 / 70, C 07H 21 / 04, C 07H 21 / 04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A, P	JP, 7-170998, A (イッサム・リサーチ・ディベロップメント・カンパニー・オブ・ザ・ヘブル・ユニバーシティ・オブ・エルサレム) 11. 7月. 1995 (11. 07. 95) 特許請求の範囲 & EP, 652290, A	1-9
A	JP, 6-508029, A (シタス オンコロジー コーポレイション) 14. 9月. 1994 (14. 09. 94) 特許請求の範囲 & WO, 9220795, A	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 09. 96

国際調査報告の発送日

10.09.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA / JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4C

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)